中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）41(2)：169～177（1992）

香水百合〝Casa Blanca〞莖頂培養之大量繁殖[1]

紀 海 珊[2]　　葉 常 青[3]

摘要：香水百合之鱗莖，剝去其外圍之鱗片，取約300～400μm含 1 對葉原體之莖頂，培養於含有0.2 ppm NAA AA、4 ppm BA、3%蔗糖及0.8%洋菜之 Murashige and Skoog (1962)(MS)基本鹽類培養基中，經2個月的培養，可形成約 1.5cm 大小之原球體，此原球體培養於含有 0.5ppm NAA、4 ppm BA、3%蔗糖及0.8%洋菜之 MS 基本鹽類培養基中可行原球體之增殖；而培養於含有0.2 ppm 2,4-D、0.5 ppm BA、3%蔗糖及0.8%洋菜之 MS 基本鹽類培養基中則可誘導植株形成。爲了縮短幼苗生長時間，可將已長有 0.2cm 小芽之原球體，培養於含有 0.1 ppm NAA，2 ppm BA、3%蔗糖之 MS 基本鹽類液體培養基中，7天內即可獲得鱗片葉 6cm 之幼苗，將此幼苗移殖於3%蔗糖及0.8%洋菜之 MS 基本鹽類之培養基中，經7天之生長即可誘導發根。此具有根系之幼苗移殖於泥炭苔等介質中，置於二層40—50%遮光網之簡易塑膠溫室中健化，健化期間以細霧式自動噴霧噴灑葉面，每30分鐘噴3—4秒，2週後去除一層遮光網；約經1個月後，即可將苗行 2-5°C之低溫處理以打破休眠，再經1—1.5個月，即可移殖於田間行養球栽培。

關鍵詞：香水百合、大量繁殖

由於進口葵百合類之種球成本費用較高，因而生產之切花單價居高不下，目前國內市場消費需求仍穩定持續成長中，故花農栽植之意願仍高，水葵百合外銷實力遠超過姬百合，曾有外銷日本高達30萬支以上數量的成績，而其平均單價約可達百元以上，爲我國賺取不少的外匯。據瞭解，外銷日本的葵百合中，以白色的香水百合（Casa Blanca）品種爲主，曾有業者花費數百萬元向荷蘭購買種球。爲了降低種苗成本，建立快速且大量生產健康種球之組織培養繁殖技術實屬刻不容緩。

材料與方法

一、材　料：

香水百合 Oriental lily “Casa Blanca” 之鱗莖

二、方　法：

(一)材料之消毒與接種：

將鱗莖外圍之鱗片剝去，以0.5%次氯酸鈉（每50ml 加入1滴 Tween 20）消毒10分鐘後，以無菌水清洗三次，用鑷子取出，剝去剩餘之鱗片，取 300-400μm 含1對葉原體之莖頂，培養於含有 10ml 斜面固體培養基之試管中。

(二)培養基組成之測試：

以不同組合及濃度之植物生長調節劑，配合　Murashige and Skoog (1962) (MS) 基本

1. 臺灣省農所　研究報告第 1619 號。本研究承農委會補助經費，謹致謝忱。
2. 國立嘉義農業專科學校園藝科講師。臺灣省　嘉義市。
3. 本所農藝系助理。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

鹽類[6]（表一～表四）及不同之培養方式，測試對香水百合莖頂培養、原球體增殖、誘導植株發生與加速植株生長及發根之影響。

以上材料均在25±1°C恒溫、1,500Lux 之光強及光期16小時的環境下培養。

㈢不同介質對組織培養苗移殖成活率之影響：

將已發根且帶1—2片鱗片葉，葉長約 6cm 之組織培養苗移出瓶外，以水清洗後，分別移至表五之八種介質中，放置於上有二層40—50%遮光網之簡易塑膠溫室中，栽培環境之日／夜溫爲30—32°C/20—21°C，並以細霧式自動噴霧噴灑葉片，每30分鐘噴3—4秒，經2週後，除去一層遮光網，經1個月後，將苗行2—5°C之低溫處理1—1.5個月，最後再將此苗移殖田間行養球栽培。

結　果

一、莖頂培養誘導原球體之形成：

表1顯示 300—400μm 含1對葉原體之莖頂，在含有 8ppm BA之培養基所形成之原球體最大，但形狀爲扁平硬塊，與一般正常的原球體形狀略有差異，而 4ppm BA所誘導之原球體，其表面爲圓形突起，顏色深綠品質較佳（如圖一），因此由莖頂誘導原球體之產生以含4ppm BA之培養基較好。

Table 1. Influence of plant growth regulators (PGR) on the protocorm-forming ability in the shoot-tip culture of Oriental lily*

PGR Conc. (ppm)		No. of Protocorm Produced wirh Diameter (cm) of			Appearance of Protocorm
NAA	BA	0.2—0.4	0.5—0.8	0.9—1.2	
0.2	2	40	0	0	Light green
0.2	2	0	40	0	Light green, globular
0.2	4	0	0	40	Dark green, globular
0.2	8	0	0	40	Dark green, flat

* Basal medium was MS salts plus 3% sucrose and 0.8% Phytagar. 40 shoot tips were cultured for 60 days in each treatment.

二、原球體之增殖與原球體誘導植株之形成：

將原球體切成 0.5cm 大小，培養於表2（固體）及表3（液體）之培養基中，經培養60天對原球體之增殖而言，在固體培養基中（表2）相同 BA 濃度之搭配下，0.5 ppm NAA 誘導原球體增殖之效果比 0.2 ppm 2,4-D 效果好，而以 0.5 ppm NAA 及 4 ppm BA 之組合誘導原球體增殖之效果最好。液體培養中（表3）0.5 ppm NAA 中，低濃度之 BA 大都誘導原球體長成小芽，而高濃度 BA 之原球體則有增殖之效果，但仍不如固體培養之方式好。而0.2ppm之2,4-D在液體之培養方式則都誘導原球體長成植株，且對植株有健化之效果。唯 BA 之濃度越高，植株葉片有漸黃化之情形發生。因此對原球體誘導植株之形成而言，以 0.2 ppm 2,4-D 與 0.5 ppm BA 之組成效果最好。對培養方式而言在此濃度之下以固體或液體之培養方式均可。

Table 2. Influence of plant growth regulators (PGR) on the growth and differentiation abilities of protocorm in solid culture*

PGR Conc. (ppm)			No. of Protocorm Produced wirh Diameter (cm) of		No. of Protocorm Producing Buds	Length of Scale Leaf (cm)
2,4-D	NAA	BA	0.6—0.9	1.0—1.5		
0	0.5	0.5	0	0	40	3
0	0.5	1	0	0	40	3
0	0.5	2	20	0	20	3
0	0.5	4	0	40	0	0
0	0.5	8	0	40	0	0
0.2	0	0.5	0	0	40	4
0.2	0	1	8	0	32	4
0.2	0	2	12	0	28	3
0.2	0	4	20	0	20	3
0.2	0	8	20	0	20	3

* Basal medium was MS salts plus 3% sucrose and 0.8% Phytagar. 40 protocorms measuring 0.5×0.5cm in size were cultured for 60 days.

Table 3. Influence of plant growth regulators (PGR) on the growth and differentiation abilities of protocorm in liquid culture*

PGR Conc. (ppm)			No. of Protocorm Produced with Diameter (cm) of		No. of Protocorm Producing Buds	Length of Scale Leaf (cm)
2,4-D	NAA	BA	0.6—0.9	1.0—1.5		
0	0.5	0.5	8	0	32	3
0	0.5	1	8	0	32	2
0	0.5	2	8	0	32	2
0	0.5	4	0	20	16	2
0	0.5	8	0	20	16	1.5
0.2	0	0.5	0	0	40	6
0.2	0	1	0	0	40	5
0.2	0	2	0	0	40	3
0.2	0	4	0	0	40	2
0.2	0	8	0	0	40	2

* Basal medium was MS salts plus 3% sucrose. 40 protocorms measuring 0.5×0.5cm in size were cultured for 60 days.

三、促進植株加速生長及發根：

將表2含有 0.2 ppm 2,4-D 及 0.5 ppm BA 之 MS 培養基所誘導形成長約 0.2cm 小芽原球體（如圖二），培養於含有 0.1 ppm NAA，2 ppm BA，3%蔗糖之MS 基本鹽類之液體培養基中，以 100rpm 水平往復式振盪培養5天，植株可達 5cm，至第七天以後則生長速率減緩，此培養7天後之植株可作爲發根試驗之材料（圖三）。將上述植培養於表4之固體培養基中，結果顯示在三種溫度處理下，25°C之根數及根長均遠較20°C及15°C二處理爲高，約在培養2天後即可見到

0.1-0.2cm 之根，經14天後 1 ppm IBA 誘導之根較少而粗，不含植物生長調節劑之對照組及 1ppm NAA 誘導之根較多而細。而根長則以25°C下，不含植物生長調節劑之對照組最長，平均約為1.82公分。因此香水百合瓶苗之發根，以不添加任何植物生長調節劑之 MS 基本鹽類培養基且在室溫之下（25°C）效果最好（表四），大約培養7天即可移植於介質上（圖四）。

圖1. 百合莖頂培養於 0.2 ppm NAA 及 4 ppm BA 培養基所誘導形成之原球體，顏色深綠。
Fig. 1. Dark-green protocorms produced form the culturing shoot tip of oriental lily in a medium supplemented with 0.2 ppm NAA and 4 ppm BA.

圖2. 原球體培養於含有 0.2ppm 2,4-D 及 0.5 ppm BA之固體MS培養基，誘導形成具有長約 0.2cm 小芽之原球體。
Fig.2. Bud regeneration could be induced after culturing the protocorm in a solid medium supplemented with 0.2 ppm 2,4-D and 0.5 ppm BA.

Table 4. Influence of plant growth regulators (PGR) and temperature on the rooting ability of adventitious buds of Oriental lily*

PGR Conc. (ppm)		Temperature	No. of Roots	Root Length
NAA	IBA	(°C)	Produced	(cm)
1	0	25	14.1 (8.07)	0.5 (0.11)
1	0	20	4.2 (3.78)	0.4 (0.23)
1	0	15	1.5 (1.56)	0.3 (0.29)
0	1	25	8.1 (4.03)	0.8 (0.25)
0	1	20	5.4 (2.36)	0.5 (0.32)
0	1	15	5.3 (2.77)	0.3 (0.08)
0	0	25	13.0 (2.83)	1.8 (0.37)
0	0	20	4.1 (2.27)	0.6 (0.21)
0	0	15	3.0 (1.38)	0.4 (0.26)

* Basal medium was MS salts plus 3% sucrose and 0.8% Phytagar. Culture duration was 14 days. Datas in parentheses are standard deviations.

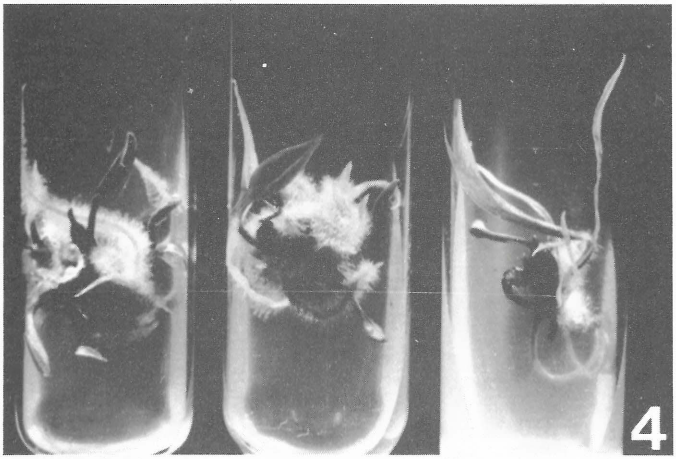

圖3. 將圖2具有小芽之原球體培養於含有 0.1 ppm NAA, 2 ppm BA 及 3 %蔗糖之 MS 液體培養基，以 100rpm 往復式振盪培養7天可獲得鱗片葉約 6cm之百合苗。

Fig. 3. Further culture of protocorm with regenerated buds in a liquid medium contained MS salts, 0.1 ppm NAA, 2 ppm BA and 3% sucrose, and shaked at 100 rpm, produced seedlings about 6 cm in length in 7 days.

圖4. 百合試管苗培養於25°C，不含植物生長調節劑之 MS 培養基（右）與含 1 ppm NAA（左），1 ppm IBA （中），14天後發根情形之比較。

Fig. 4. Well-developed roots of the seedlings cultured in a solid medium supplemented with no plant growth regulator (right), as compared with the addition of 1 ppm NAA (left) and 1 ppm IBA (middle).

四、不同介質之瓶苗移殖試驗：

將結果三已誘導發根之瓶苗移殖於表五之八種介質中，經14天後，調查其成活率及根系發育之情形。

結果顯示除了人造土：4號蛇木屑（1：1）及4號蛇木屑：泥炭苔（1：1）二種組合之介質，移殖植株於14天後全數死亡以外，其餘成活率均達85%以上（表5），而植株發育情形以泥炭苔最好，顏色翠綠，其次爲粉末蛇木屑植株顏色亦翠綠，再依次爲炭炭苔：珍珠石，及珍珠石，其次爲蛭石：珍珠石，最後蛭石：4號蛇木屑。根系之發育情形則以珍珠石爲最好，粉末蛇木屑次之，再其次爲泥炭苔：珍珠石（1：1）與泥炭苔者，再次爲珍珠石：蛭石（1：1），最後則爲泥炭苔：4號蛇木屑（1：1）。

Table 5. Influence of soil-mixture components on the survival of Oriental 1：1 seedlings form shoot-tip culture after transplanting*

Soil-mixture Component	No. of Seedling Survived	Survival Rate (%)
Perlite (No.3)	38	95 (83～100)
Peatmoss	36	90 (75～98)
Perlite (No.3):Peatmoss (1/1, V/V)	36	90 (75～98)
Artificial soil (No. 2):Treefern (No. 4) (1/1, V/V)	0	0 (0～10)
Treefrn (No. 4):Peatmoss (1/1, V/V)	0	0 (0～10)
Vermiculite (No. 2):Treefern(No. 4) (1/1, V/V)	34	85 (69～94)
Powder treefern	38	95 (83～100)
Vermiculite (No. 2):Perlite (No. 3) (1/1, V/V)	34	86 (71～95)

* 40 seedlings were cultured for 14 days in each treatment. Datas in parentheses are the 95% confidence limits.

移殖後之苗約在10—14天開始有新葉生長，而其中約有半數苗原有之老葉黃化枯萎，而八月中以後不太長新葉，似乎溫度太高呈現休眠狀態，而後於10月1日移入 2 — 5 °C之冷藏室內低溫處理，經一個月後於11月9日移出冷藏室種於田間觀察其生育情形，此後養球之部分目前仍試驗中。

結　論

有關百合組織培養大量繁殖之技術，Takayama and Misawa 曾經報導，利用切割後之鱗片培養，可誘導出小鱗莖，再將此小鱗莖誘導出不定芽，配合固體或液體之培養方式，1個鱗片1年內可繁殖多達1.2－3.2×10^{12}個植物體[8]。本研究利用 300-400μm 之莖頂進行原球體之誘導，再以此原球體爲基礎進行大量繁殖，估計一年約可獲得1.1×10^6個小苗（圖5），雖繁殖數量遠不及 Takayama and Misawa 的結果，但莖頂培養因具有去除病毒之功效[1,2,4,9]，故本研究所獲得的結果，仍深具意義。

Tsay et al. 報導半夏珠芽經培養後，可誘導芽球類似體（protocorm-like body）之產生，將此芽球類似體連續不斷的切割及增殖，再誘導出大量的不定芽，據估計，一個珠芽經1年的繁殖可獲得1.7×10^{27}個小苗[7]；本文香水百合以先誘導原球體形成的方式大量繁殖，其過程與半夏的繁殖方法極爲類似，此種以類似原球體之方式進行大量繁殖之例子，蘭科植物極爲普遍。Aitken-Christie et al. 曾敍述輻射松（*Pinus radiata*）的大量繁殖法，就是利用分生組織所形成之結狀物（meristematic nodules）經連續不斷的切割及再生而達成[3]。Mc Cown et al. 也發現白楊（populus）分生組織所形成之結狀物，以液體培養方式可達到大量繁殖之目的[5]。這些結狀物在構造上似乎與本文所述之原球體或半夏所產生之芽球類似體極爲相近。這種以原球體大量繁殖的方式，沒有癒合組織所面臨分化再生之困難，且原球體可極容易的在培養基中大量繁殖，應是大部分園藝作物進行組織培養大量繁殖之最佳途徑。

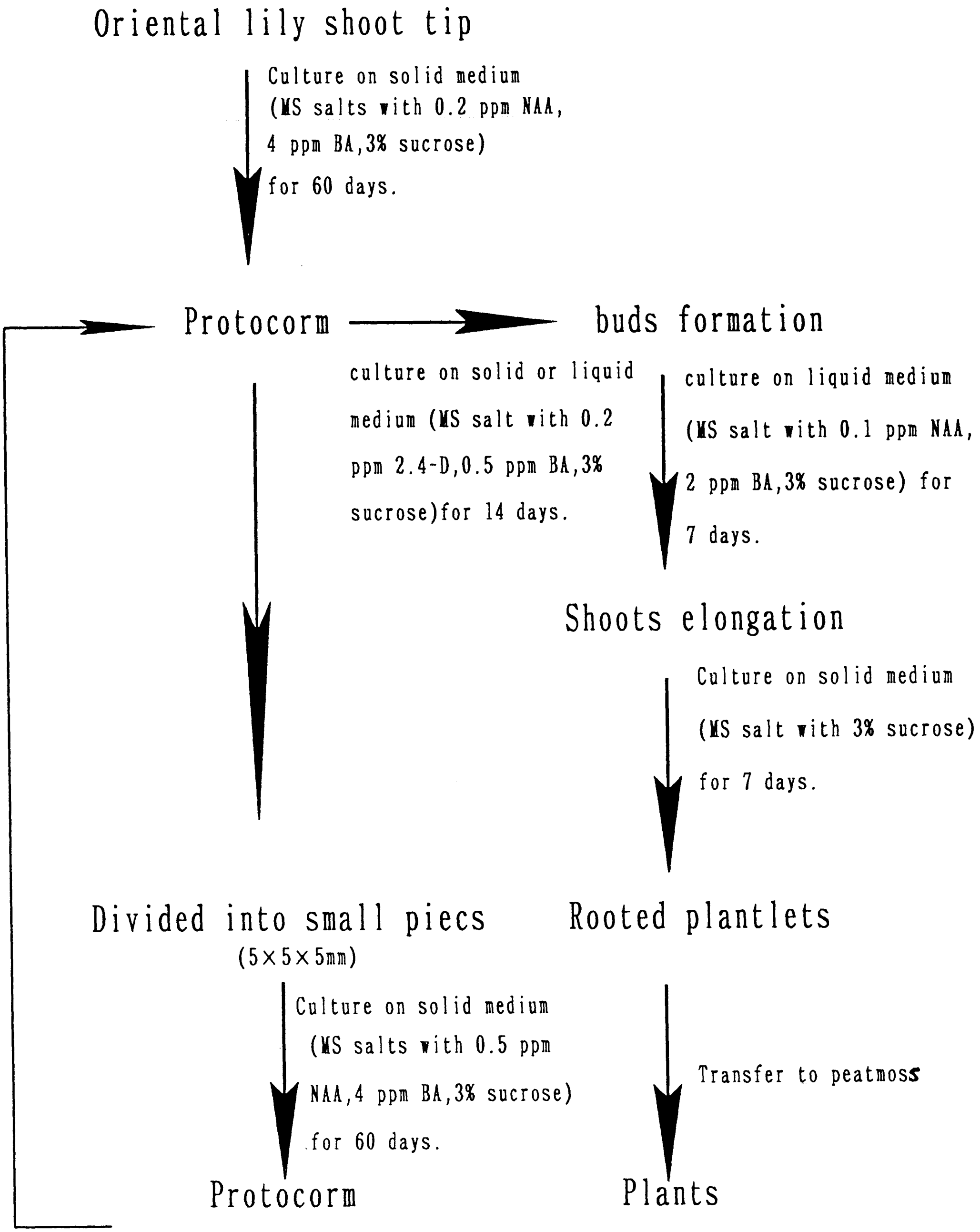

圖5. 香水百合大量繁殖流程圖

Fig 5. Scheme of mass propagation of Oriental lily "Casa Blanca"

參考文獻

1. 柯南靖。1989・簡易植物病毒診斷圖鑑。國立中興大學植物病理學系出版 pp.23-72.
2. Allen, T.C. 1975. Viruses of lilies and their control. Acta. Horticulture, 47:69-75.
3. Aitken-Christie, J., A.P. Singh, and H. Davies. 1987. A new tissue culture system for *Radiata pine*.In : Symposium on Genetic Manipulation of Woody Plant. June 21-25, Michigan State Univ. pp. 413 -432.
4. Bertaccini, A. and F. Marani.1982. Electron microscopy of two viruses and mycoplasma-like organisms in lilies with deformed flowers. Phytopath. Medit. 21, 8-4.
5. McCown, B.H., E.L. Zeldin, H.A. Pinkalla, R.R. Dedolph. 1987. A developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In : Symposium on Genetic Manipulation of Woody Plant. June 21-25, 1987, Michigan state Univ. pp. 149-166.
6. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-493.
7. Tsay, H. S., T. G. Gau, and C.C. Chen. 1989. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue culture. Plant Cell Reports 8:450-454.
8. Takayama, S. and M. Misawa. 1983. A scheme for mass propagation of Lilium *in vitro*. Sci. Horti. 18 : 353 -362.
9. Varma, A., A. Gibbs. and R. Ikin. 1979. Viruses in lilies; lily symtomless virus and a possiblere virus, detected by electron microscopy. Aust. Plant Path. 8 : 38-39.

Mass Propagation of Oriental Lily "Casa Blanca" by Shoot Tip Culture[1]

H. S. Gi and C. C. Yeh[2]

Summary

Mass propagation of Oriental lily by shoot tip culture was developed for the purpose of accelerating the propagation rate and avoiding the transmission of virus. Bulb scales of "Casa Blanca" containing 1 pair of leaf primordia, measuring about 300-400 im in size, were excised from the bulb and cultrued. The composition of the medium was MS salts supplemented with 0.2 ppm NAA, 4 ppm BA, 3% sucrose and 0.8% phytagar. Protocorms about 1.5 cm in diameter could be produced after 2 months in culture. Significant proliferation of the protocorm could be observed by culturing in the same medium except the concentration of NAA was increased from 0.2 to 0.5 ppm. Plants regeneration could be induced if the protocorm were cultrued in medium contained 0.2 ppm 2,4-D, 0.5 ppm BA, 3% sucrose, and 0.8% phytagar. To accelerate the growth rate of the regenerated seedlings, protocorms with buds about 0.2cm in length were transferred to liquid medium with 0.1 ppm NAA, 2 ppm BA, and 3% sucrose. The length of bulb scale leaves could reach 6 cm in 7 days under the culture conditions. Further culture of the seedlings in solid medium plus MS salts, 3% sucrose, and 0.8% phytagar promoted the differerntiation of root system. The recommended 1month hardening procedure of the seedlings included the use of peatmoss, 40-50% shading, and frequent mist-spray irrigation. The seedlings could then be treated with low temperature (2-5°C)for 1-1.5 months for breaking dormancy before transplanted to the field.

Key words : CaSa blanca, Mass propagation

1. Contribution No. 1619 from Taiwan Agriultural Research Institute. Financial support from the Council of Agriculture, Executive Yuan, is appreciated.
2. Respectively, Instructor, Department of Horticulture, National Chiayi Institute of Agriculture, and Research Assistant, Department of Agronomy, TARI.